

ARTIKEL PENELITIAN

Pengaruh Paparan Induksi Hipoksia Hipobarik terhadap Fungsi Kognitif dan Reseptor Glutamat pada Tikus Sprague-Dawley

Fanny Septiani Farhan^{1*}, Angelina SR Masengi², Margaretha Herawati³,
Wawan Mulyawan⁴, Sri Widia A. Jusman⁵, Mohamad Sadikin⁵

¹Departemen Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Jakarta, Indonesia

²Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi, Manado, Indonesia

³Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Mustopo Beragama, Jakarta, Indonesia

⁴Lembaga Kesehatan Penerbangan dan Ruang Angkasa Dr. Saryanto, Jakarta, Indonesia

⁵Pusat Kajian Hipoksia dan Stres Oksidatif, Departemen Biokimia & Biologi Molekuler,
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

*Corresponding author: fannybudian@gmail.com

Disetujui 21 Desember 2018

DOI: 10.23886/ejki.6.10126.

Abstrak

Induksi hipoksia subletal memberikan efek neuroprotektif pada proses patologis seperti infark miokard dan stroke. Penelitian ini bertujuan melihat efek induksi hipoksia hipobarik intermiten (HHI) terhadap fungsi kognitif dan reseptor glutamat. Penelitian dilakukan di Lembaga Kesehatan Penerbangan dan Ruang Angkasa Saryanto (LAKESPRA) TNI AU, tahun 2015-2016. Sebanyak 25 tikus sprague-dawley, dibagi 4 kelompok perlakuan HHI dan 1 kelompok kontrol. Kelompok 1 diinduksi dengan 1x paparan HHI, kelompok 2 diinduksi dengan 2x paparan HHI, kelompok 3 diinduksi dengan 3x paparan HHI, dan kelompok 4 diinduksi dengan 4x paparan HHI (hari ke-1, ke-8, ke-15 dan ke-22). Setelah induksi, dilakukan pemeriksaan fungsi kognitif dengan Y Maze dan reseptor neurotransmitter glutamat N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) di jaringan otak. Tidak ada perbedaan signifikan antara empat kelompok perlakuan ($p > 0,05$) dengan kelompok kontrol pada pemeriksaan fungsi kognitif, namun terdapat perbedaan bermakna pada perubahan reseptor NMDA. Disimpulkan, induksi HHI tidak menyebabkan perubahan fungsi kognitif namun meningkatkan respons neuroplastisitas di jaringan otak tikus sprague-dawley yang dinilai dari perbaikan reseptor NMDA.

Kata kunci: HHI; fungsi kognitif; neuroprotektif; glutamat; NMDA.

Effect of Hypobaric Hypoxia Induction on Cognitive Function and Glutamate Receptor in Sprague-Dawley Rats

Abstract

Induction of sublethal hypoxia provides neuroprotective effect pathological processes such as myocardial infarct and stroke. This study aimed to know the effect of intermittent hypobaric hypoxia (IHH) induction on cognitive function and glutamate receptor in the rat brain. The study was conducted at dr. Saryanto Institute for Aviation and Aerospace Health (LAKESPRA) from 2015-2016. 25 sprague dawley rats, divided into 4 IHH treatment groups and 1 control group. Group 1 was induced with 1x IHH exposure, group 2 was induced with 2x IHH exposure, group 3 was induced with 3x IHH exposure and group 4 was induced with 4x IHH exposure (days 1, 8, 15 and 22). After induction, cognitive function tests are performed with Y Maze and immunohistochemistry is performed to evaluate the glutamate receptor N-methyl-D-aspartic acid (NMDA). There were no significant differences between the four treatment groups compared with the control group ($p > 0.05$) on cognitive function, but significant difference in NMDA receptor. In conclusion, HHI induction was not cause change cognitive fuction but increased the response of neuroplasticity of sprague-dawley rats brain tissue which assessed from increasing NMDA receptor.

Key words: IHH; cognitive function; neuroprotective; glutamate; NMDA.

Pendahuluan

Kondisi hipoksia tidak selalu berdampak negatif terhadap tubuh bahkan pajanan hipoksia ringan berdampak neuroprotektif. Hipoksia dengan kadar dan jangka waktu yang dapat ditoleransi akan memberikan efek perlindungan (*preconditioning*), sehingga dapat meningkatkan resistensi sel terhadap pajanan hipoksia berikutnya. *Hypoxia preconditioning* adalah pajanan hipoksia intermiten subletal yang tidak merusak jaringan, bahkan dapat menginduksi perubahan ekspresi gen dan jalur sinyal.^{1,2} Pada *hypoxia preconditioning* terjadi mekanisme adaptasi untuk mengantisipasi hipoksia pada level seluler maupun sistemik. Gen *hypoxia inducible factor 1* (HIF-1) adalah gen kunci yang berperan penting dalam menjaga kelangsungan hidup. Gen HIF-1 menyebabkan terjadinya transkripsi protein yang diperlukan untuk adaptasi terhadap hipoksia.³

Hipoksia hipobarik intermiten (HHI) adalah salah satu bagian dari *hypoxia preconditioning* yang dilakukan dengan memberikan pajanan hipoksia subletal pada tekanan barometrik rendah dan berulang-ulang dalam jangka waktu tertentu. Perlakuan HHI memberikan efek neuroprotektif terhadap otak dan jantung.⁴ Pascaperlakuan HHI akan diikuti dengan penurunan tingkat stres oksidatif dan terjadi adaptasi selular terhadap timbulnya senyawa oksigen reaktif (SOR) berupa peningkatan aktivitas MnSOD, enzim katalase, dan glutathione peroksidase. Hidayat et al⁵ meneliti efek pajanan HHI terhadap stres oksidatif dan apoptosis sel jantung tikus menyimpulkan bahwa tikus yang mengalami HHI memiliki tingkat stres oksidatif hampir sama dengan kelompok tikus kontrol dan terjadi penurunan apoptosis sel pada pajanan ketiga hipoksia. Penelitian Gamdzyk et al⁶ pada tikus yang mengalami kerusakan jaringan otak akibat hipoksia, menunjukkan pajanan HHI 7 hari pascakerusakan otak menurunkan tingkat stres oksidatif dan peningkatan aktivitas superoksida dismutase serta glutathione peroksidase. Kenyataan tersebut membuktikan terjadinya efek neuroprotektif yang signifikan berupa peningkatan pertahanan antioksidan pasca pajanan HHI.⁶

Pajanan HHI juga menimbulkan adaptasi terhadap aktivitas eritropoiesis. Rodriguez et al⁷ membuktikan bahwa terjadi peningkatan jumlah eritrosit, retikulosit, kadar hemoglobin dan saturasi oksigen arteri pasca HHI. Peningkatan eritropoiesis mengakibatkan meningkatnya jumlah oksigen dan penghantaran oksigen ke jaringan yang mengalami hipoksia. Pascapajanan hipoksia

intermiten juga diikuti perbaikan terhadap struktur anatomis jaringan otak. Vorobiev et al⁸ mengamati perubahan struktural otak pascapajanan HHI dan menyimpulkan bahwa terjadi penurunan jumlah kematian sel neuron di korteks dan hipokampus otak tikus.

Kondisi hipoksia juga memicu respons neuroplastisitas di sel otak. Proses neuroplastisitas dipicu oleh aktivitas neurotransmitter glutamat. Neuron presinaps melepaskan glutamat dan mengakibatkan depolarisasi di neuron postsinaps, sehingga terjadi peningkatan ion Ca^{2+} di neuron *post sinaps*.⁹ Peningkatan ion Ca^{2+} menginduksi banyak peristiwa biokimia yang berperan penting dalam proses plastisitas sinaps. Sinyal intraseluler mengaktifkan kaskade neuroplastisitas dan menimbulkan pertumbuhan dendrit baru sebagai mekanisme responsif terhadap gangguan kondisi hipoksia di jaringan otak. Munculnya tonjolan dendrit baru akan meningkatkan dan memperbaiki struktur dan fungsi neuron akibat kondisi tidak menguntungkan di jaringan seperti hipoksia dan cedera otak.^{10,11} Penelitian ini bertujuan untuk mengamati apakah proses induksi HHI memiliki dampak terhadap fungsi kognitif dan perubahan reseptor glutamat.

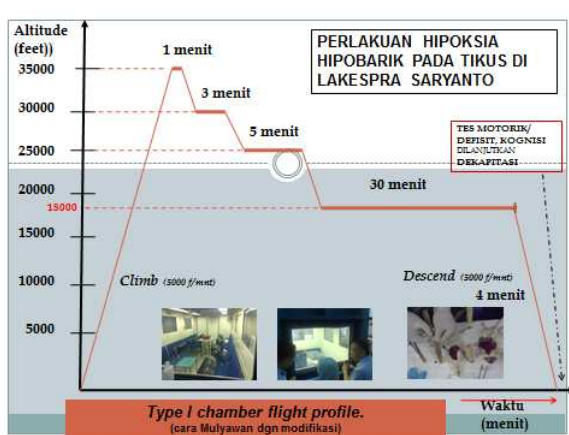
Metode

Penelitian ini menggunakan desain kuasi eksperimental paralel acak dan dilakukan di Lakespra Saryanto TNI AU pada bulan Januari 2015 - Januari 2016. Hewan coba yang digunakan adalah 5 kelompok tikus sprague-dawley jantan usia 2 bulan dengan berat 200-250 g. Masing-masing kelompok terdiri atas 5 tikus. Penelitian ini merupakan bagian dari payung penelitian HHI menggunakan (modifikasi) *hypobaric chamber training* di Lembaga Kesehatan Penerbangan dan Ruang Angkasa DR. Saryanto (Lakespra Saryanto) TNI AU Jakarta. Penelitian terdahulu yang telah dilakukan adalah analisis ekspresi HIF 1 α , protein GLUT-1 dan derajat kerusakan jaringan sebagai respons adaptasi pasca perlakuan HHI. Penelitian ini dilakukan setelah lolos kaji etik dari Komite Etik FKUI-RSCM No. 426/UN2.F1/ETIK/2014.

Perlakuan Hipoksia Hipobarik Intermiten

Tikus ditempatkan di Lakespra TNI AU mulai 3 minggu sebelum pelaksanaan agar dapat beradaptasi; kebutuhan makan dan minum ad libitum. Perlakuan hipoksia hipobarik sesuai prosedur *ILA type I chamber flight profile* (Gambar 1). Tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok

kontrol yang tidak menjalani perlakuan hipoksia, dan kelompok 1 sampai 4. Penomoran kelompok sesuai jumlah ulangan paparan hipoksia. Dilakukan demo hipoksia pada ketinggian 35000 kaki selama 1 menit, turun ke 3000 kaki selama 3 menit, kemudian turun ke 25000 kaki selama 5 menit dan pada ketinggian 18000 kaki selama 30 menit; kemudian ketinggian diturunkan dengan kecepatan 5000 ft/menit. Selanjutnya tikus menjalani pemeriksaan fungsi kognitif dan jaringan otak tikus diambil untuk pemeriksaan imunohistokimia reseptor glutamat yaitu *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDA).



Gambar 1. Protokol Hipoksia Hipobarik⁵

Pada minggu pertama HHI, sebanyak empat kelompok tikus menjalani perlakuan hipoksia hipobarik. Setelah perlakuan, tikus kelompok 1 menjalani evaluasi fungsi kognitif dan pengambilan jaringan otak. Pada minggu kedua HHI sisa tiga kelompok tikus menjalani perlakuan hipoksia hipobarik. Setelah perlakuan, kelompok 2 menjalani evaluasi fungsi kognitif dan pengambilan jaringan otak. Pada minggu ketiga sisa dua kelompok tikus menjalani perlakuan hipoksia hipobarik. Setelah perlakuan, kelompok 3 menjalani evaluasi fungsi kognitif dan pengambilan jaringan otak. Pada minggu terakhir kelompok 4 menjalani perlakuan hipoksia hipobarik. Sebelum di dekapitasi, dilakukan dislokasi dengan menarik tulang servikal dan torakal secara cepat hingga tikus mati. Jaringan otak diambil dan dimasukkan ke formalin 10%.

Pemeriksaan Fungsi Kognitif

Tikus dilatih untuk mengetahui lorong yang berisi makanan untuk menilai *spatial working memory*. Dinding lorong diwarnai hitam dan

putih. Lorong hitam berada di sebelah kanan dan makanan diletakkan di ujungnya sedangkan lorong putih berada di sebelah kiri. Tikus harus mempelajari lokasi makanan berdasarkan warna dinding. Satu hari sebelum perlakuan HHI, tikus menjalani tes 3 kali dengan interval 5 menit. Lama tes pascaperlakuan HHI diukur dan dibandingkan dengan kontrol.^{11,12}

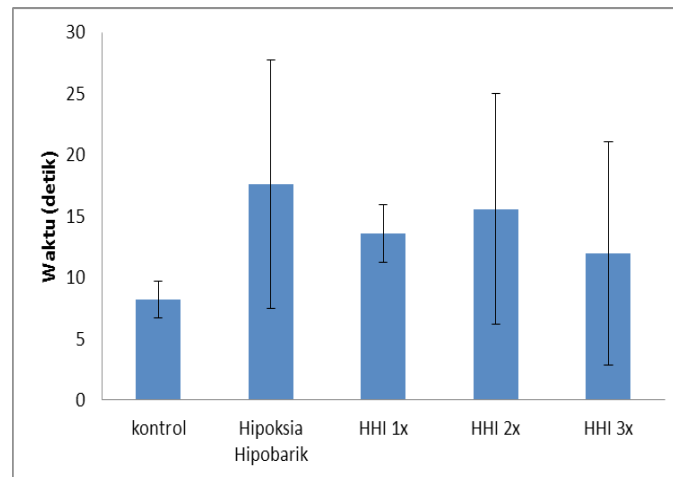
Pemeriksaan Reseptor Glutamat di Jaringan Otak Tikus

Jaringan otak yang telah disimpan di dalam formalin 10% dipotong tipis berukuran 5 μ m menggunakan mikrotom. Pemotongan dilakukan pada lokasi 1,5-2,5 mm anterior dari titik bregma untuk mendapatkan korteks prefrontal. Potongan ditempelkan ke gelas objek dan diberi identitas kemudian ditambahkan larutan antibodi primer yaitu *glutamat reseptor*, *N-Methyl D-Aspartate 2a/GRIN2A* (ABIN1686638) dan *trekkie universal link* sebagai antibodi sekunder. Ekspresi reseptor glutamat dinilai berdasarkan reaksi reseptor NMDA dengan antibodi anti GRIN2A yang dilabel dengan avidin-HRP. Warna coklat timbul akibat penguraian diaminobenzidine (DAB) oleh HRP. Ekspresi positif ditandai dengan warna kecoklatan di membran maupun sitoplasma sel neuron. Hasil pewarnaan IHK diamati dengan menggunakan mikroskop *Olympus inverted IX73*. Pembacaan dilakukan terhadap lima preparat untuk masing-masing kelompok. Tingkat ekspresi dinyatakan sebagai jumlah rerata sel neuron yang menghasilkan warna coklat di *frontal association cortex* pada lima lapang pandang kecil (LPK).

HASIL

Uji Kognitif Pasca Induksi HHI

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa pascaperlakuan hipoksia hipobarik pertama, terjadi peningkatan lama waktu tempuh tikus untuk menemukan lorong berisi makanan. Tikus terlama yang dapat menemukan makanan berada pada grup hipoksia hipobarik. Rerata waktu tembus tikus untuk menemukan lorong pada masing-masing kelompok kontrol, HH, HHI 1x, HHI 2x dan HHI 3x adalah 7 detik, 17 detik, 13 detik, 15 detik dan 10 detik. Setelah paparan HHI 1x dan 3x terlihat perbaikan skoring waktu tempuh tikus untuk menemukan lorong berisi makanan. Tidak terdapat perbedaan bermakna ($p > 0,05$, Anova) terhadap kemampuan fungsi kognitif tikus antara kelompok kontrol dan pascaperlakuan HHI.

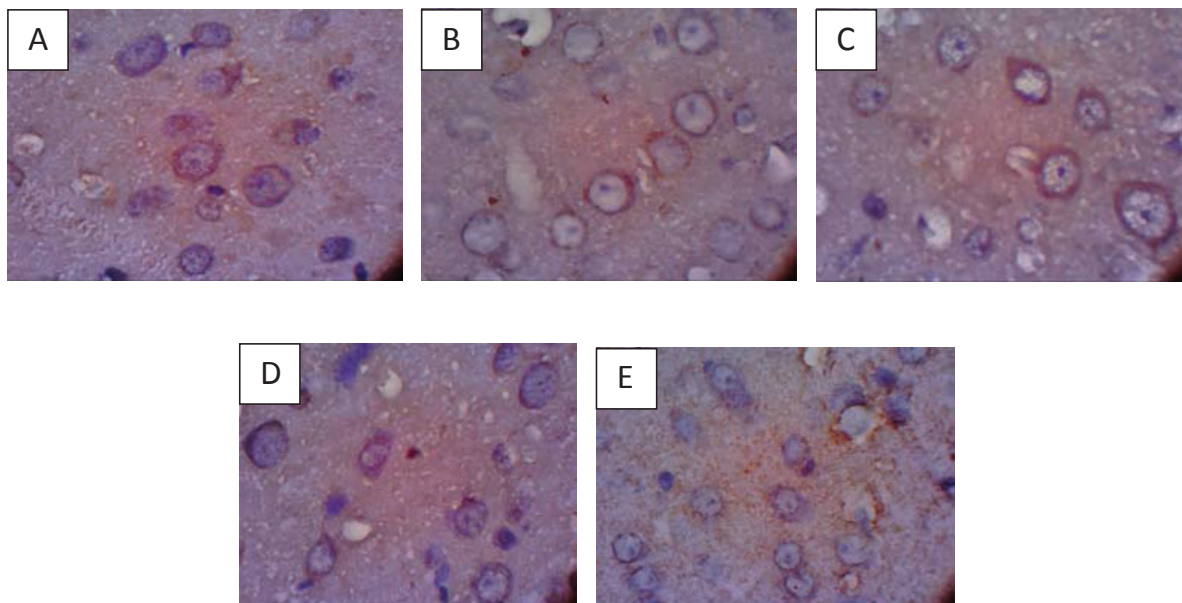


Gambar 2. Perubahan Rerata Waktu Tempuh Uji Kognitif pada Tikus Pascaperlakuan HH dan HHI Dibandingkan Kontrol (detik)

Perubahan Jumlah Reseptor Glutamat

Gambar 3 menunjukkan hasil pemeriksaan imunohistokimia jaringan otak tikus. Reseptor NMDA dapat terlihat pada sel-sel neuron, glial, dan terdapat hampir diseluruh regio otak. Jika

dibandingkan dengan kontrol, ekspresi NMDA pada jaringan HH menurun signifikan. Ekspresi NMDA meningkat mulai perlakuan HHI 1x, mencapai puncaknya pada HHI 2x dan pada paparan HHI 3x ekspresi NMDA kembali menurun.

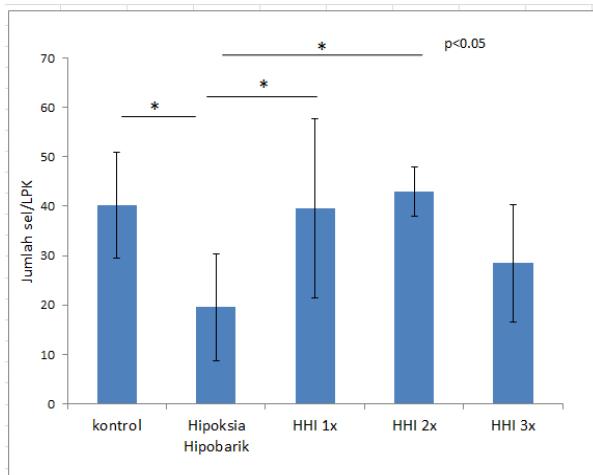


Gambar 3. A-E: Sediaan IHK Korteks Pembesaran 100x, Dilabel dengan Antibodi Anti GRIN2A. Gambar A (Kontrol). B: Kelompok Hipoksia Hipobarik. C: Kelompok HHI 1x. D: Kelompok HHI 2x. E: Kelompok HHI 3x

Dari Gambar 4 terlihat bahwa jumlah rerata reseptor NMDA tertinggi terdapat di kelompok perlakuan HHI 2x ($201,2 \pm 14,2$) dan terendah di kelompok hipoksia hipobarik saja atau kelompok 1 ($97,8 \pm 8$). Terdapat perbedaan bermakna jumlah

rerata reseptor NMDA kelompok kontrol dan kelompok yang mendapatkan perlakuan hipoksia hipobarik ($p=0,03$, Anova). Selanjutnya dilakukan uji LSD *Post Hoc* untuk melihat perbandingan jumlah rerata reseptor NMDA antar kelompok perlakuan.

Dari hasil uji *Post Hoc* didapatkan perbedaan bermakna antar kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan hipoksia hipobarik ($p=0,013$) serta terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan hipoksia hipobarik saja dengan kelompok perlakuan HHI 1x ($p=0,016$) dan perlakuan HHI 2x ($p=0,06$), namun tidak ada perbedaan bermakna jumlah reseptor NMDA antara kelompok perlakuan HHI 3x dengan control ($p=0,255$).



Gambar 4. Rerata Jumlah Sel yang Mengekspresikan Reseptor NMDA pada Masing-masing Kelompok. * $p<0,05$

Pembahasan

Fungsi dan struktur jaringan otak sangat bergantung pada ketersediaan oksigen dan glukosa. Gangguan pada ketersediaannya dapat mengganggu fungsi otak ringan hingga berat, bahkan dapat menyebabkan kematian. Neuroplastisitas timbul sebagai respons terhadap perubahan kebutuhan oksigen yang terjadi di sel otak.

Adaptasi Fungsi Kognitif Pasca-Induksi HHI

Pada penelitian ini kemampuan kognitif terburuk terdapat di kelompok hipoksia hipobarik. Kondisi tersebut disebabkan neurotoksisitas yang disertai kerusakan jaringan. Pada kelompok hipoksia hipobarik kerusakan korteks terjadi paling berat, namun seiring dengan perlakuan intermiten pada paparan berikutnya, mulai timbul perbaikan pada fungsi kognitif dan motorik tikus. Diduga, paparan intermiten tidak menyebabkan kerusakan permanen terhadap kemampuan kognisi dan motorik.

Hasil serupa diperoleh Shao et al¹³ yang membandingkan perbaikan fungsi kognitif

spasial pada mencit yang menjalani perlakuan normoksia, hipoksia tunggal dan hipoksia intermiten sebanyak 4 kali. Pengukuran fungsi kognitif menggunakan parameter *Morris water maze* dan didapatkan kemampuan fungsi kognisi terbaik terjadi di kelompok yang menjalani perlakuan intermiten. Tsai et al¹⁴ melaporkan bahwa hipoksia intermiten memperbaiki defisit memori dan kognisi pascapaparan iskemia jaringan otak. Wittner et al¹⁵ yang meneliti orientasi memori spasial pascapaparan hipoksia hipobarik membuktikan bahwa orientasi memori spasial menjadi lebih baik jika dibandingkan kontrol. Pascaperlakuan HHI terjadi respons adaptasi fisiologis berupa perbaikan fungsi motorik dan kognitif yang mendekati fungsi normal pada kelompok kontrol.

Penurunan ringan konsentrasi oksigen di jaringan otak akan menginduksi proliferasi, ketahanan sel dan diferensiasi neuron. HIF 1 α sebagai *master switch gene* menjadi stabil dan mengaktifkan gen hilir seperti seperti vascular *endothelial growth factors* (VEGF), *erythropoietin* (Epo), *insulin like growth factors-1* (IGF-1) dan lain-lain yang berperan penting menjaga ketersediaan oksigen serta glukosa jaringan.³ Paparan intermiten juga meningkatkan aktivitas *brain derived neurotropic factors* (BDNF) yang merupakan protein regulator pada proses neuroplastisitas sehingga akan disintesis protein baru yang akan memperbaiki konduktivitas neuron. Perbaikan konduktivitas neuron akan berdampak pada perbaikan fungsi kognitif tikus. Schega et al¹ meneliti efek hipoksia intermiten pada fungsi kognitif dan perbaikan kualitas hidup. Dari penelitian tersebut disimpulkan bahwa terjadi peningkatan fungsi kognitif pascapaparan hipoksia intermiten.

Adaptasi Reseptor Glutamat Pasca Induksi HHI

Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol, ekspresi NMDA pada paparan hipoksia hipobarik menurun secara signifikan. Hal tersebut menimbulkan dugaan bahwa neurotoksisitas sebagai penyebab timbulnya kematian sel karena sel belum terlatih menghadapi hipoksia. Neurotoksisitas menyebabkan influs ion kalsium dalam jumlah besar, yang menyebabkan aktivasi nitrit oksida sintetase membentuk nitrit oksida, *calcium sensitive proteases* dan kerusakan mitokondria. NO yang merupakan bagian dari ROS menyebabkan nitrasasi protein, oksidasi protein, peroksidasi lipid dan kerusakan DNA yang berakhir dengan kematian

sel. Hal tersebut diamati oleh Gascon et al¹⁷ yang meneliti efek eksitotoksisitas dan iskemia serebral terhadap NMDA subunit NR2a dan NR2B dan *post synaptic density 95* (PSD95). Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa pada kondisi iskemia, terjadi perubahan morfologi sel neuron berupa kondensasi inti dan perubahan ukuran badan sel. Perubahan yang terjadi menunjukkan keadaan iskemia progresif ke arah kematian sel.

Eksresi NMDA meningkat mulai perlakuan HHI 1x dan mencapai puncaknya pada HHI 2x. Pada pajanan HHI 3x, eksresi NMDA kembali menurun, walaupun penurunannya tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Penurunan tersebut disebabkan proses adaptasi seluler terhadap kondisi hipoksia dimana HIF 1 α sebagai *master switch gene* telah mengaktifkan gen hilirnya untuk menjaga ketersediaan oksigen seluler. Walaupun belum dapat dibuktikan bahwa eksresi NMDA bekerja di bawah kendali HIF 1 α , dapat diduga bahwa perlakuan intermiten memberi efek proteksi dari kematian sel karena peningkatan hantaran oksigen dan glukosa ke dalam sel neuron. Pada pajanan terakhir, fungsi sel telah pulih termasuk fungsi yang berhubungan dengan glutamat sehingga kondisi kembali kepada keadaan awal.

Kesimpulan

Dibandingkan dengan hipoksia hipobarik tunggal, HHI tidak memperbaiki fungsi kognitif namun meningkatkan respons neuroplastisitas di jaringan otak tikus sprague-dawley yang dapat dilihat dari perubahan reseptor NMDA.

Daftar Pustaka

1. Jones NM, Lee EM, Brown TG, Jarrot B, Beart PM. Hypoxic preconditioning produces differential expression of hypoxia inducible factor 1 α (HIF 1 α) and its regulatory enzyme HIF prolyl hydroxylase 2 in neonatal rat brain. *Neurosci lett*. 2006;404:72-7.
2. Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzie ET, Petit E, Schumann-Bard P. Normobaric hypoxia induced tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia inducible factor 1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:393-403.
3. Semenza GL. Hypoxia inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. 2000;588-94.
4. Costa DC, Alva N, Trigueros L, Gamez A, Carbonell T, Rama R. Intermittent hypobaric hypoxia induces neuroprotection in kainate-induced oxidative stress in rats. *Mol Neurosci*. 2013;50:402-10.
5. Hidayat A, Wiradisastra K, Hernowo B, Achmad TA. Paparan hipoksia hipobarik intermiten menurunkan stres oksidatif dan apoptosis sel jantung pada tikus jantan sprague dawley. *J Indon Med Assoc*. 2011;61(7):289-92.
6. Gamdzyk M, Makarewicz D, Słomka M, Ziembowicz A, Salinska E. Hypobaric hypoxia postconditioning reduce brain damage and improves antioxidative defense in the model of birth asphyxia in 7 day old rats. *Neurochem res*. 2014;39:68-75.
7. Rodríguez FA, Ventura JL, Casas M, Casas H, Pagés T, Rama R, et al. Erythropoietin acute reaction and haematological adaptations to short, intermittent hypobaric hypoxia. *Eur J Appl Physiol*. 2000;82:170-7.
8. Vorobiev, MG, Rybnikova, A, Samoilov, M Changes in the severity of hypoxic brain damage in rats due to hypoxic postconditioning. *Neurosci behav physiol*. 2013;43(1):6-9.
9. Sherwood, L. Human physiology. Edisi ke-3. Belmont, CA; 2000.
10. Mayadevi M, Archana G, Prabhu R, Omkumar RV. Molecular mechanisms in synaptic plasticity. *Rocz Akad Białymst*. 2004;49:295-330.
11. Behavioral test performed at the laboratory of neurobiology of CIPF. [internet] 2014 [Diakses 2 Februari 2014]. diunduh dari www.sici.umh.es.
12. Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2001;15(1):8-12.
13. Shao G. Hypoxia preconditioning improves spatial cognitive ability in mice. *Neurosignals*. 2006;15:314-21.
14. Tsai YW, Yang YR, Wang PS, Wang RY. Intermittent hypoxia after transient focal ischemia induces hippocampal neurogenesis and c-fos expression and reverse spatial memory deficits in rats. *Plos ONE*. 2011;6(8):e24001.
15. Wittner M, Riha P. Transient hypobaric hypoxia improves spatial orientation in young rats. *Physiol Res*. 2005;54:335-40.
16. Schega L, Peter B, Torpel A, Mutschler H, Isermann B, Hamacher D. Effects of intermittent hypoxia on cognitive performance and quality of life in elderly adults: a pilot study. *Gerontology*. 2013;59(4):316-23.
17. Gascón S, Sobrado M, Roda JM, Rodríguez-Pena A, Díaz-Guerra M. Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95. *Mol Psychiatry*. 2008;13:99-114.